Untersuchungen über einen strahleninduzierten Reparaturmechanismus beim Escherichia coli-Bakteriophagen λ

Ingrid Haselbacher

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547028_0074

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München

Untersuchungen über einen strahleninduzierten Reparaturmechanismus beim *Escherichia coli*-Bakteriophagen λ

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

Vorgelegt von
Ingrid Haselbacher
aus Marl
1980

Mit Genehmigung der Fakultät für Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. K.-R. Trott
Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Lissner
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12.2.1981

DISSERTATIONS UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Der Bakteriophage	6
2.2.	Liste der verwendeten Bakterienstämme	6
2.3.	Nährmedien und Puffer	6
2.4.	Phagenanzucht und Reinigung des Rohlysates	7
2.5.	Bestimmung des Phagentiters	8
2.6.	Bestrahlungsquellen und Durchführung der Bestrahlung	9
2.7.	Berechnung der Überlebensrate	10
3.	Ergebnisse	11
3.1.	Extrazelluläre Bestrahlung des Phagen $\underline{\lambda}$	
3.1.1.	UV-Inaktivierung und kombinierte Röntgen-UV-Bestrahlung	11
3.1.2.	Röntgeninaktivierung und kombinierte UV-Röntgen-Bestrahlung	13
3.2.	Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen $\underline{\lambda}$ durch röntgenbestrahlte Wirtszellen	
3.2.1.	Versuche zur Dosisabhängigkeit der induzierten Phagenreaktivierung	15
3.2.2.	Versuche zur genetischen Kontrolle der induzierten Phagenreaktivierung	23
3.2.3.	Versuche zur Kinetik des durch Röntgenbestrahlung induzierten Reparatursystems	25
4.	Diskussion	35
5.	Zusammenfassung	40
6.	Literaturverzeichnis	42

1. Einleitung

Die große Bedeutung der Anwendung von Strahlen in der medizinischen Praxis, aber auch die zunehmende Strahlenexposition des Menschen durch die technisierte Umwelt, machen es nötig, in gesteigertem Maße Untersuchungen über die Wechselwirkungen der verschiedenen Strahlungsarten mit der belebten Natur anzustellen.

Bei der Suche nach geeigneten Untersuchungsobjekten fiel die Wahl unter anderem auf Bakteriophagen, weil die Phagen-Wirtszellen-Beziehung ein relativ einfach zu handhabendes System bei der Erkennung von Strahlenschäden und ihrer Reparatur darstellt.

Im Jahr 1964 fand Haynes heraus, daß bei kombinierter UV- und Röntgenbestrahlung des Bakteriums Escherichia coli B/r das Überleben der bestrahlten Zellen geringer ist, als eine Addition der Einzeleffekte erwarten ließ, d.h. ein synergistischer Effekt der Strahlenwirkung eintritt. In den folgenden Jahren wurde dieses Phänomen an verschiedenen Mikroorganismen untersucht (Haynes, 1966; Bhaumik et al., 1968; Durban et al., 1969; Clarkson et al., 1971). Durch Versuche vor allem an Bakterien konnte festgestellt werden, daß in den Zellen Reparaturenzyme vorhanden sind, die die Aufgabe haben, Schäden an der DNA, die durch verschiedene Ursachen, z.B. durch Bestrahlung, entstanden sind, auszubessern. Die Gene, die für die Bildung dieser Enzyme verantwortlich sind, können natürlich genauso geschädigt werden wie die übrige DNA. Martignoni und Smith (1973) konnten zeigen, daß der synergistische Effekt von UV und Röntgenstrahlen auf das Überleben der Bakterien auf der Ausschaltung bestimmter Reparaturmechanismen beruht.

Die vorliegende Arbeit will diese Problemstellung der wechselseitigen Reparaturbeeinflussung durch UV und Röntgenbestrahlung ausweiten, um festzustellen wie Bakteriophagen,

die über keine Reparaturenzyme im extrazellulären Zustand verfügen auf eine Kombinationsbehandlung reagieren (vgl. Hill, 1958).

Wenn der Synergismus andererseits bei kombinierter Bestrahlung von Phagen auftritt, kann er nicht nur auf dem von Martignoni und Smith (1973) beschriebenen Mechanismus beruhen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung von kombiniert angewandter Röntgen- und UV-Bestrahlung auf das Überleben des Bakteriophagen lambda auf Bakterienwirten mit unterschiedlicher Reparaturkapazität. Um die Untersuchungen verständlicher zu machen, soll zunächst ein Überblick über die bisher bekannten, verschiedenen Reparatursysteme und ihre genetische Kontrolle gegeben werden, um die Einordnung der Ergebnisse in einen größeren Zusammenhang zu erleichtern.

Reparaturmechanismen bei E.coli und seinen Phagen

Biologische Erscheinung	Genetische Bezeichnung	Genetische Kontrolle
1. Photoreaktivierung		phr
2. Wirtszellreaktivierung (Host-cell-reactivation=HCR)	Ausschneide-Reparatur (excision repair)	uvrA, uvrB, uvrC, T4v
3. Prophagenreaktivierung, Multiplizitätsreaktivierung, Kreuzungsreaktivierung	Rekombinations-Reparatur (pre-replicative)	T4x, T4y
4. Rekombinations-Reparatur	Rekombinations-Reparatur (post- replicative)	recA, recB, recC, recE, recF, xon
5. Weigle-Reaktivierung (UV-Reaktivierung, SOS-Reparatur error prone repair	Fehlerbehaftete, induzierte Reparatur	lexA, lexB, tif, recA

1. Photoreaktivierung: Bei der Photoreaktivierung handelt es sich um einen sowohl bei Mikroorganismen als auch bei Säugetieren auftretenden Reparaturmechanismus, der die durch UV-Bestrahlung entstandenen Thymindimere in der DNA wieder spaltet. Verantwortlich dafür ist ein Enzym, das durch das Gen phr codiert wird. Diese Art von Reparatur von DNA-Schäden stellt die einfachste Form dar.

2. Wirtszellreaktivierung (Dunkelreaktivierung):
Bei der Wirtszellreaktivierung ist ein Komplex aus 4 Enzymeinheiten nötig, um die Thymindimere als solche aus der DNA auszuschneiden ("excision repair"). Da dieses System nicht auf sichtbares Licht, wie die Photoreaktivierung angewiesen ist, wurde es auch Dunkelreaktivierung genannt. Säugetierzellen verfügen ebenfalls über diese Art von Reparaturmechanismus. Das Krankheitsbild der Xeroderma pigmentosum wird durch den Ausfall des "excision repair" ausgelöst.

3. und 4. Rekombinationsreparatur:
Der Begriff Rekombinationsreparatur besagt, daß die Beseitigung von Strahlenschäden durch Rekombination (d.h. Neuordnung der Erbsubstanz) stattfindet. An Stellen mit Thymindimeren in der DNA kann keine normale DNA-Replikation ablaufen. Es entstehen Lücken im Komplementärstrang, die durch "crossing over" und Reparatur-Replikation geschlossen werden. Die Ausdrücke "pre-replicative" und"post-replicative" bedeuten, daß die Rekombinationsvorgänge, die zur Reparatur führen, vor und nach der DNA-Replikation erfolgen können. Da sich die englischen Ausdrücke eingebürgert haben, wurde auf eine Übersetzung verzichtet.
Unter Punkt 3 werden Reaktivierungssysteme, die unter der Kontrolle von Bakteriophagengenen ablaufen, zusammengefaßt. Allen ist gemeinsam, daß die geschädigte DNA eines Phagen, der eine Wirtszelle infiziert hat, durch Rekombination mit der DNA eines gleichzeitig in der Zelle vorhandenen anderweitig geschädigten oder ungeschädigten Phagen gleichen Typs

repariert werden kann.
Unter Punkt 4 sind solche Gene aufgeführt, welche die bei Bakterien auftretende Rec-Reparatur kontrollieren. Mit der Bezeichnung "error prone" wird ausgesagt, daß diese Art von Reparatur zu einer großen Anzahl von Mutationen führt.
Die folgende Arbeit befaßt sich mit der unter Punkt 5 genannten induzierten Phagenreaktivierung (Weigle- oder UV-Reaktivierung). Die Untersuchungen dazu begannen im Jahre 1953. Damals stellte Weigle fest, daß UV-bestrahlte Bakteriophagen auf einem UV-bestrahlten Wirt besser überleben als auf einem unbestrahlten Wirt. Er nannte dieses Phänomen UV-Reaktivierung (UVR). Die in den folgenden Jahren durchgeführten Versuche zeigten, daß es sich dabei um ein eigenes Reparatursystem handelt, das unabhängig von den unter Punkt 1-4 in der Tabelle aufgeführten Systemen abläuft (Kneser et al., 1965; Ono et al., 1966; Boyle et al., 1970; Defais et al., 1971; Radman et al., 1971; Blanco et al., 1973).
Die genetische Kontrolle der UV-Reaktivierung (siehe Tabelle) wurde unter anderen von Miura et al. (1968), Defais et al. (1971) und Blanco et al. (1975) untersucht.
Interessante Ergebnisse brachten die Versuche von Otsuji et al. (1960), die zeigen konnten, daß dieses Reparatursystem nicht nur durch eine UV-Bestrahlung des Wirtes, sondern auch durch eine Behandlung mit Mitomycin C induziert werden kann.

Außerdem ist die UV-Reaktivierung nicht auf das Bakteriophagen-Bakterien-System beschränkt, sondern tritt auch bei Herpes simplex-Viren in Säugetierzellkulturen auf (Bockstahler und Lytle, 1971; Hellman et al., 1974; Bockstahler et al., 1976). Bockstahler und Lytle untersuchten dabei die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Wirtszellen als Auslösefaktor der Virusreaktivierung. Ono et al. (1966) hatten bereits zuvor eine Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen ØR, der einzelsträngige DNA enthält, durch röntgenbestrahlte Wirtszellen feststellen können.
Im folgenden wird nun die Frage untersucht, ob die Reaktivierung eines doppelsträngigen DNA-Phagen λ durch Röntgenbestrahlung der Wirtszellen ebenfalls induziert werden kann.

Da eine UV-Bestrahlung nicht der einzige Auslösefaktor ist, versucht man zur Zeit, die Bezeichnung UV-Reaktivierung (UVR) durch eine neue zu ersetzen. So schlägt Radman (1975) vor, den Ausdruck W-Reaktivierung zu Ehren des Entdeckers Weigle zu gebrauchen.
Hier wird der von Devoret eingeführte Terminus Induzierte Phagenreaktivierung verwendet.

2. Material und Methoden

2.1. Der Bakteriophage

Da die vorliegende Arbeit sich unter anderem mit der Untersuchung der Wirkung von UV-Strahlen auf den Bakteriophagen λ befaßt, mußte die Induktion der Phagenentwicklung im Wirtsbakterium durch Bestrahlung mit UV-Licht vermieden werden. Deshalb wurde die Klarplaques-Mutante λcI 857 gewählt, die durch Hitzeinduktion aus dem lysogenen Wirtsbakterium E. coli C 600 (λcI 857) freigesetzt wurde.

2.2. Liste der verwendeten Bakterienstämme:

Stamm E. coli K-12:	Prophage	Genotyp	Verhalten gegenüber λ
AB 1157 (Saclay)	-	Wildtyp (alysogen)	sensibel (λ^s)
AB 1886 (Saclay)	-	uvr A6	sensibel (λ^s)
AB 2463 (Saclay)	-	rec A13	sensibel (λ^s)
AB 2470 (Saclay)	-	rec B21	sensibel (λ^s)
C 600 (Inst. für Genetik Uni. Mchn.)	λcI 857	Wildtyp (lysogen)	resistent (λ^r)

Die Stämme sind polyauxotroph und vom F-Sextyp.

2.3. Nährmedien und Puffer:

TBY:	Trypton (Difco)	10 g
	Yeast Extract (Difco)	5 g
	NaCl (Merck)	5 g
	ad 1000 ml demineralisiertes	H_2O pH 7.5

LB:	Trypton (Difco)	10 g
	Yeast Extract (Difco)	5 g
	NaCl (Merck)	10 g
	mit Zusätzen:	
	Maltose (Merck)	2 g
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$ (Merck)	2×10^{-2} M

ad 1000 ml demineralisiertes H_2O pH 7.0
Nach dem Autoklavieren wurden 5 ml 20 %iger Glucoselösung pro Liter zugesetzt.

Zur Bereitung von Weichagar wurden 0.6 %, zur Bereitung von Agar für Platten 1.2 % Difco-Agar verwendet.

TM-Puffer:	Tris (Sigma)	0.01 M
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.01 M

mit 1 N HCl auf pH 7.5 eingestellt

2.4. Phagenanzucht (nach Wackernagel, 1972) und Reinigung des Rohlysates (nach Albertsson, 1967)

Der Phage λcI 857 wurde durch Hitzeinduktion aus dem logarithmisch wachsenden lysogenen Stamm E. coli C 600 (λcI 857) freigesetzt. 10 ml Übernachtkultur (ÜK) von E. coli C 600 (λcI 857) in TBY wurden auf 1000 ml TBY angeimpft und die Kultur wurde unter ständigem Belüften bei 30° C (Wasserbad-Temperatur 32° C) im Wasserbad gehalten. Bei einem Zelltiter von ca. 7×10^8 Zellen/ml erfolgte die Hitzeinduktion des Prophagen. Dazu wurde die Kultur 15 min lang auf 44°C (Wasserbad-Temperatur 46° C) erwärmt. Anschließend wurde bei 37° C bis zur Lyse der Zellen weiterbelüftet (ca. 90 min).
Die im Rohlysat vorhandene Wirtszellen-DNA wurde durch 10 µg/ml Desoxyribonuclease I (aus Rinderpankreas, Reinheitsgrad II, Boehringer/Mannheim) verdaut. Nach niedrigtouriger Zentrifugation (5000 rpm) schloß sich die Reinigung des Rohlysates an.

In einem 2l-Schütteltrichter wurde 1 l Rohlysat mit 75 g PEG (Polyäthylenglycol 6000, Merck), 2 g Dextran (Dextran Sulphate, Na-Salz, Pharmacia Fine Chemicals) und 17.5 g NaCl versetzt und alles unter Schütteln gelöst. Nach ca. 24 h Inkubation bei 4° C im Kühlschrank wurde die trübe Unterphase gesammelt und 20 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand (PEG) wurde verworfen, das weißliche, schleimige Sediment mit 1/2 Volumen 3 M KCl verrührt und 1 h bei 4° C inkubiert. Das entstandene weiße, feste Präzipitat aus K-Dextransulfat wurde abzentrifugiert (20 min bei 5000 rpm). Der Überstand enthielt die gereinigten Phagen. Das Präzipitat wurde anschließend noch mit 1/4 Volumen TM-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und über Nacht gegen TM-Puffer (1 x Wechseln) dialysiert.

2.5. Bestimmung des Phagentiters

Die Zellen einer Übernachtkultur des Wildtyps *E. coli* AB 1157 wurden abzentrifugiert, einmal mit TM-Puffer gewaschen und 1 : 10 in TM-Puffer verdünnt. Auf diese Weise erhielt man die Adsorptionsbakterien, die bei der Verwendung stationärer Wirtszellen gleichzeitig Indikatorbakterien waren. Zur Präadsorption der Phagen an die Wirtszellen wurden 0.1 ml Phagenverdünnung in TM-Puffer mit 0.2 ml Adsorptionsbakteriensuspension in einem Glasröhrchen gemischt und 15 min bei 37° C im Schüttelwasserbad inkubiert. Das Verhältnis Anzahl der Phagen zur Anzahl der Bakterien (multiplicity of infection - m.o.i.) war immer < 0.01. Die optimale Präadsorptionszeit wurde mit Hilfe einer Adsorptionskurve nach Adams (1966) bestimmt: Nach 15 min Präadsorption waren 90 % der Phagen an Wirtszellen adsorbiert. Anschließend kamen zu jedem Ansatz 2.5 ml LB-Weichagar, der bei 50° C im Wasserbad flüssig gehalten wurde, und der Röhrcheninhalt wurde auf eine Platte mit

LB-Agar gegossen. Die Platten wurden ca. 20 h bei 30° C bebrütet. Der Titer des Lysates lag ungefähr bei 2.5 x 10^{11} Phagen/ml.

2.6. Bestrahlungsquellen und Durchführung der Bestrahlung

Die Röntgenbestrahlung wurde mit einer Dermopan-Röntgenanlage von Siemens bei einer Röhrenspannung von 50 kV und einem Anodenstrom von 25 mA ohne Filterung unter O_2-Begasung durchgeführt. Phagen und Bakterien waren in 5 ml LB (Schichtdicke: 2mm) mit Zusätzen suspendiert (Phagentiter ca. 10^9/ml). Der Fokus-Objekt-Abstand betrug 75 mm. Als Bestrahlungsmedium wurde LB gewählt. Die Dosisleistung in der Bestrahlungskammer wurde in regelmäßigen Abständen mit Hilfe der Fricke-Dosimetrie (Fricke und Hart, 1966) bestimmt. Für die UV-Bestrahlung wurden die Phagen wegen der geringen Durchdringungsfähigkeit der UV-Strahlen in einem möglichst wenig absorbierenden Medium, in 5 ml TM-Puffer, suspendiert (Phagentiter ca. 10^8-10^{10}/ml). Um annähernd die gleiche Wirkung in LB Medium zu erreichen, müßte die 10-fache Exposition angewendet werden. Die Bestrahlungsquelle war eine ozonfreie Hg-Niederdruck-Lampe Typ HNS 10 (Osram). Die Wellenlänge der angewendeten Strahlen lag bei 254 nm. Die Messung des UV-Flusses erfolgte mit Hilfe eines Germicidal Photometers IL 254 und einer Vakuum-Photodiode (Photosensor PT 100, mit größter Empfindlichkeit bei 253.7 nm, (International Light, Inc.). Die Phagensuspension (Schichtdicke ca. 1 mm) befand sich in einer offenen Glaspetrischale (ø = 7.5 cm) und wurde während der Bestrahlung ständig gerührt (Magnetrührer). Um eine Photoreaktivierung der UV-bestrahlten Komplexe zu vermeiden, wurde unter Gelblicht gearbeitet. Bei den im Abschnitt 3.1 beschriebenen Versuchen (extra-zelluläre Bestrahlung) wurden die Phagen nach der Bestrahlung in TM-Puffer verdünnt. Die Präadsorption und das Aufbringen auf die Agarplatten erfolgten wie unter 2.5 beschrieben.

Die Versuche zur Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen durch röntgenbestrahlte Wirtsbakterien (Abschnitt 3.2) wurden wie folgt durchgeführt: Die Phagen (Titer ca. 7 x 10^8/ml) wurden in TM-Puffer mit einem UV-Fluß von 100 J/m^2 bestrahlt und anschließend in dem gleichen Puffer weiter verdünnt. Für die Röntgenbestrahlung der Adsorptionsbakterien wurde eine log-Kultur von ca. 3 x 10^8 Zellen/ml in LB abzentrifugiert und in gleichem Volumen LB suspendiert. Um die Flüssigkeitsmenge während der Röntgenbestrahlung durch die Entnahme von Proben für jede zu untersuchende Dosis nicht zu reduzieren, wurden für jeden Dosispunkt der Kurve je 5 ml Bakteriensuspension bestrahlt. Das Weiterwachsen der Zellen während des Versuches wurde durch Aufbewahrung der Röhrchen in Eis verhindert. Die bestrahlten Suspensionen wurden sofort anschließend bei 5000 u/min 5 min lang zentrifugiert und zur Präadsorption mit dem UV-bestrahlten Phagen in TM-Puffer aufgenommen. Um die nach 15 min nicht adsorbierten Phagen zu entfernen, wurden die Phagen-Wirt-Komplexe abzentrifugiert, mit 0.2 ml Indikatorbakterien vermischt und mit 2.5 ml Weichagar auf die Platten gebracht. Als Indikatorbakterien diente eine log-Kultur in LB, die abzentrifugiert und nach einmaligem Waschen mit TM-Puffer in gleichem Volumen TM-Puffer aufgenommen worden war.

2.7. Berechnung der Überlebensrate

Zur Berechnung des Überlebens der bestrahlten Phagen wurde das gewogene Mittel aus der Anzahl der Plaques auf 2-3 Platten bestimmt. Für jeden Punkt der Überlebenskurven wurde der Mittelwert aus 2-3 Versuchen berechnet und der Kurvenverlauf mittels Regressionsanalyse mit einem Rechner Typ HP 65 (Hewlett-Packard, Programm "Exponential curve fit") bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1. Extrazelluläre Bestrahlung des Phagen λ

3.1.1. UV-Inaktivierung und kombinierte Röntgen-UV-Bestrahlung

Die Bestrahlung und nachfolgende Präadsorption des bestrahlten Phagen an den Wirt E. coli AB 1157 wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Da die Röntgenbestrahlung in LB erfolgte, die UV-Bestrahlung jedoch in TM-Puffer, wurden 0.05 ml der röntgenbestrahlten Phagen in LB mit 4.95 ml TM-Puffer gemischt. Der Verdünnungsfaktor von 10^{-2} wurde bei der Auswertung berücksichtigt.
In Abbildung 1 stellt die Kurve 1 das Überleben des Phagen nach verschiedenen UV-Dosen dar. Die Kurven 2, 3 und 4 sind das Ergebnis der kombinierten Röntgen-UV-Bestrahlung. Nach einer einmaligen Röntgenvorbestrahlung mit einer bestimmten Dosis wurde eine UV-Inaktivierung durchgeführt. Die verwendeten Dosen der Röntgenbestrahlung sind jeweils neben den einzelnen Kurven angegeben.
Die allgemeine Gleichung für alle Kurven lautet $y = y_o \times e^{-\alpha \cdot D}$, d.h. alle Kurven sind exponentiell. Wobei der Wert α das Maß für die Neigung der Dosiseffektkurve darstellt.
Die Kurve 1 bildet insofern eine Ausnahme, als sie erst ab einem UV-Fluß von 10 J/m^2 einen strikt exponentiellen Verlauf zeigt. Bei niedrigeren Werten weist sie eine leichte "Schulter" auf. Die folgende Tabelle zeigt die für die einzelnen Kurven gültigen Parameter einschließlich r^2 ("goodness of fit" = Korrelationskoeffizient), die durch Regressionsanalyse bestimmt wurden.

Tabelle I

Kurve Nr.	Dosis der einmaligen Röntgenvorbestrahlung (krad)	Überleben auf	Steigung α	Korrelationskoeffizient r^2
1	0	10^0	- 0.0584	0.995
2	171	1.2×10^{-1}	- 0.0569	0.994
3	285	1.4×10^{-2}	- 0.0594	0.997
4	400	3.6×10^{-3}	- 0.0617	0.997

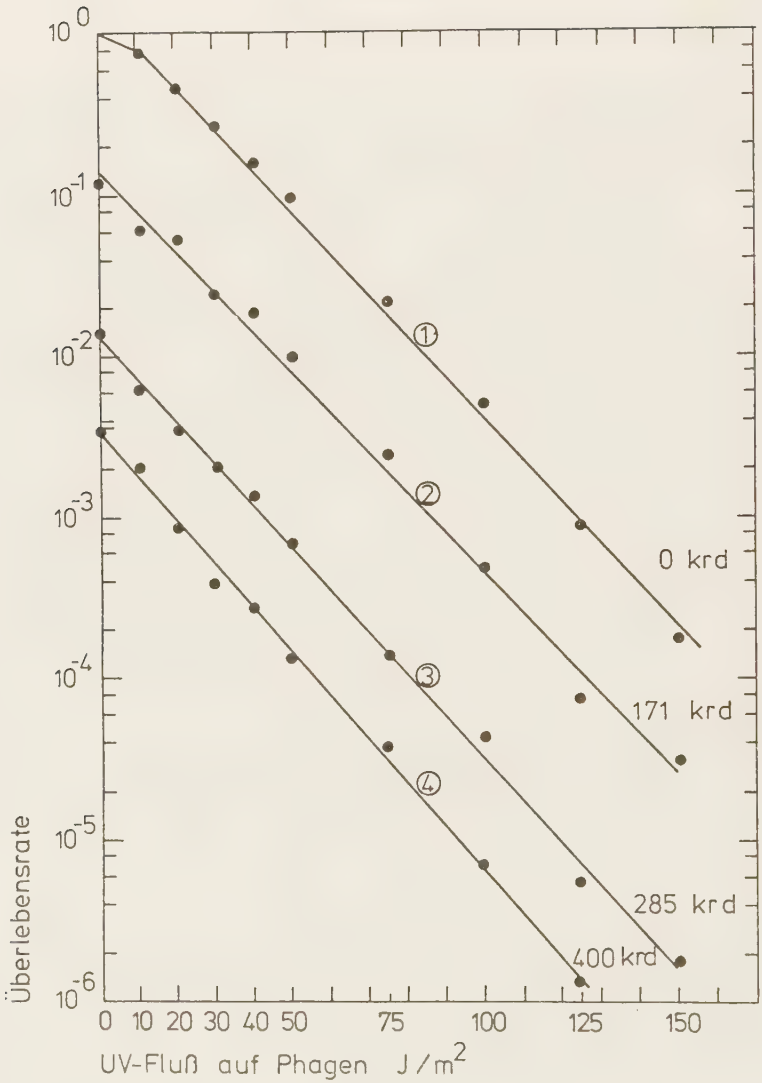

Abbildung 1:

UV-Inaktivierung und kombinierte Röntgen-UV-Bestrahlung des Phagen λcI 857.
Kurve 1 zeigt das Überleben von λ nach UV-Bestrahlung ohne Röntgenvorbestrahlung. Die Kurven 2, 3 und 4 stellen das Ergebnis der UV-Inaktivierung nach vorangegangener Röntgenbestrahlung dar. Die verwendete Dosis der Vorbestrahlung ist jeweils neben der Kurve angegeben.
Als Wirtszellen dienten stationäre Zellen des Stammes E. coli AB 1157 wt.

Aus den Werten für α sieht man, daß die einzelnen Kurven nahezu parallel verlaufen. Das bedeutet, daß bei der extrazellulären kombinierten Bestrahlung von λ in der Reihenfolge 1. Röntgen 2. UV offensichtlich eine einfache Addition der Einzeleffekte auftritt.

3.1.2. Röntgeninaktivierung und kombinierte UV-Röntgen-Bestrahlung

Bei der kombinierten Bestrahlung in der Reihenfolge 1. UV 2. Röntgen wurden zu 0.5 ml der UV-bestrahlten Phagensuspension in TM 4.5 ml LB mit Zusätzen gegeben (Verdünnungsfaktor 10^{-1}). In der Abbildung 2 ist das Überleben des Phagen nach Röntgenbestrahlung in Kurve 1 und nach kombinierter UV-Röntgenbestrahlung in den Kurven 2, 3, 4, 5 dargestellt. Der jeweils angewendete UV-Fluß der einmaligen Vorbestrahlung ist neben jeder Kurve angegeben. 1 min Röntgenbestrahlung entspricht einer Dosis von D = 5.7 krd. Die Kurven 1, 2 und 5 zeigen vergleichbar mit der Kurve 1 der Abbildung 1 wiederum erst ab einer gewissen Dosis (hier 5 min Bestrahlung, D = 28.5 krd) einen streng exponentiellen Verlauf nach der Gleichung $y = y_o \cdot e^{-\alpha \cdot D}$. Dabei fällt auf, daß die Kurven 1 und 2 eine leichte Schulter, die Kurve 5 dagegen in den niedrigeren Dosisbereichen (28.5 krad) einen stärkeren Abfall als in den darüberliegenden Bereichen zeigt. Folgende Tabelle gibt die durch Regressionsanalyse bestimmten Parameter an.

Tabelle II

Kurve Nr.	UV-Fluß J/m^2 der einmaligen UV-Vorbestrahlung	Überleben auf	Steigung α	Korrelationskoeffizient r^2
1	0	10^0	- 0.0814	0.994
2	50	1.0×10^{-1}	- 0.0885	0.987
3	83	1.4×10^{-2}	- 0.1039	0.994
4	95	4.7×10^{-3}	- 0.1055	0.995
5	150	2.5×10^{-4}	- 0.0997	0.976

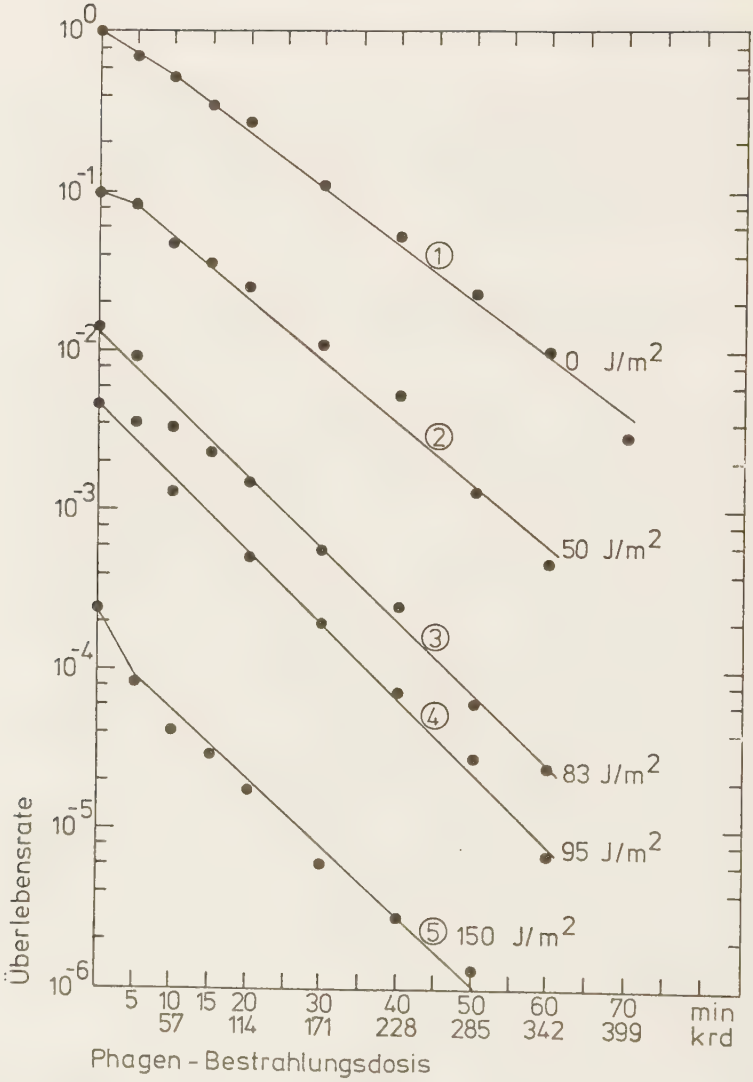

Abbildung 2:

Röntgeninaktivierung und kombinierte UV-Röntgen-Bestrahlung des Phagen λ.
Kurve 1 zeigt das Überleben von λ nach Röntgenbestrahlung ohne UV-Vorbestrahlung. Die Kurven 2, 3, 4 und 5 stellen das Ergebnis der Röntgeninaktivierung nach vorangegangener UV-Bestrahlung dar. Der verwendete UV-Fluß der Vorbestrahlung ist jeweils neben der Kurve angegeben. Als Wirtszellen dienten stationäre Zellen des Stammes E. coli AB 1157 wt.

Die Werte für α zeigen in der Reihenfolge von niedrigen zu hohen UV-Dosen eine steigende Tendenz. Das bedeutet, die Kurven werden steiler, mit Ausnahme der Kurve 5, bei der α wieder etwas niedriger liegt. Allerdings beträgt der Korrelationskoeffizient trotz mehrmals wiederholter Versuche nur $r^2 = 0.976$.

Durch die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Versuchsergebnisse konnte gezeigt werden, daß nach einer kombinierten Bestrahlung des Phagen λ in extrazellulärem Zustand keine große Veränderung der Überlebensrate auftritt. Die Wirkung der kombinierten Bestrahlung stellt eine einfache Addition der einzelnen Bestrahlungen dar. Im folgenden Kapitel wird nun die Wirkung von Reparaturenzymsystemen der Wirtszelle auf UV-bestrahlte Phagen-DNA beschrieben.

3.2. Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen λ durch röntgenbestrahlte Wirtszellen

3.2.1. Versuche zur Dosis-Abhängigkeit der induzierten Phagenreaktivierung

In Abbildung 3 ist das Überleben des UV-bestrahlten Phagen in Abhängigkeit von der den Wirtszellen (E. coli AB 1157 Wildtyp) verabreichten Röntgendosis dargestellt. Bei diesem Versuch wurde auf das Abzentrifugieren der Phagen-Wirt-Komplexe nach der Präadsorption verzichtet, da der UV-sensible Stamm E. coli AB 1886 (uvr A6) als Indikatorstamm verwendet wurde. Die nicht adsorbierten Phagen sind nicht in der Lage auf diesem Stamm Plaques zu bilden, da dieser keine Wirtszellenreaktivierung (HCR) ihrer UV-geschädigten DNA durchführen kann. Die Dosen der Röntgenbestrahlung wurden so gewählt, daß der Wirt E. coli AB 1157 nicht die Kapazität, den unbestrahlten Phagen zu vermehren verliert; (siehe Kurve 1). Bei der Kurve 1a sind die Werte auf das Überleben der UV-bestrahlten Phagen

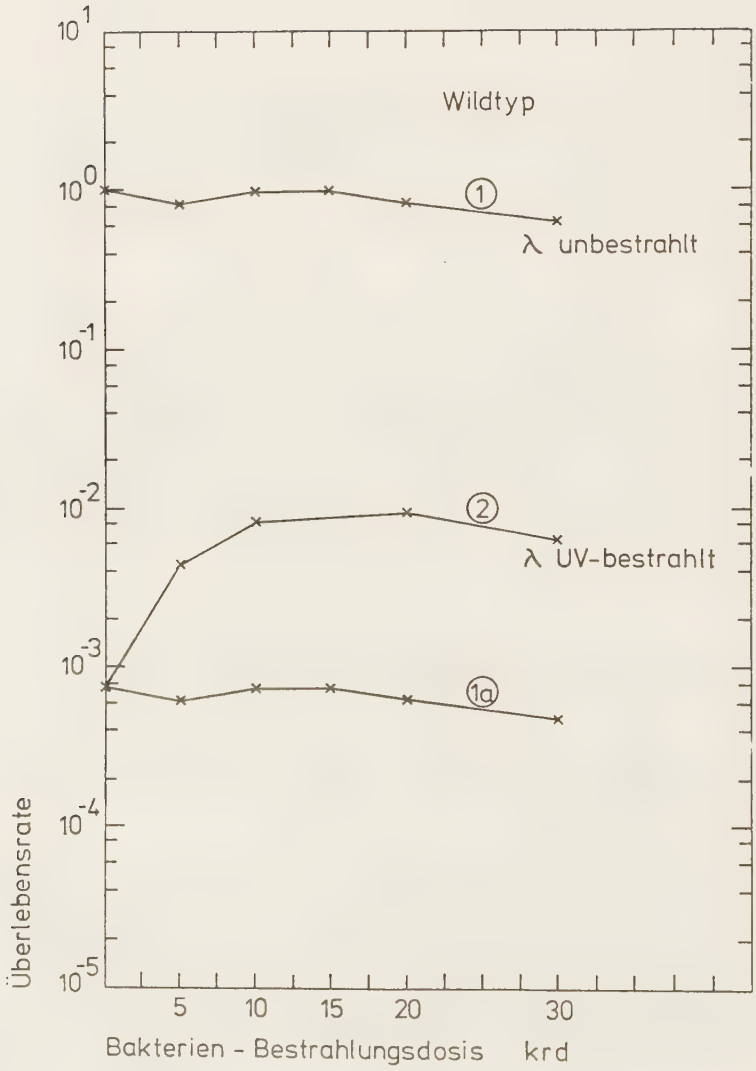

Abbildung 3:

Überleben des UV-bestrahlten Phagen λ (UV-Fluß: 100 J/m^2) auf röntgenbestrahlten Wirtszellen des Wildtyps E. coli AB 1157.

Kurve 1 : unbestrahlter Phage auf röntgenbestrahltem Wirt
Kurve 1a : Projektion der Kurve 1 auf das Überleben des UV-bestrahlten Phagen auf unbestrahltem Wirt
Kurve 2 : UV-bestrahlter Phage auf röntgenbestrahltem Wirt

auf unbestrahltem Wirt bezogen. Dadurch ist ein besserer Vergleich zwischen den Kurven 1 und 2 möglich. Letztere zeigt das Ausmaß der Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen durch den mit verschiedenen Dosen röntgenbestrahlten Wirt E. coli AB 1157. Es tritt eine deutliche Reaktivierung auf, deren Maximum in dem untersuchten Dosisbereich bei 20 krd liegt. Bei höheren Dosen fällt die Kurve leicht ab.
An dieser Abbildung ist auffällig, daß das Überleben des UV-bestrahlten Phagen bei einem UV-Fluß von 100 J/m^2 viel niedriger liegt als das auf der UV-Inaktivierungskurve der Abbildung 1 (Kurve 1). Für diesen doch recht großen Unterschied gibt es zwei Gründe:
1. In Abbildung 1 sind die Überlebensraten der UV- und kombiniert Röntgen-UV-bestrahlten Phagen aufgetragen, die mit stationären Wirtszellen ausgeplattet wurden. Hier dagegen wurden logarithmisch wachsende Wirtszellen verwendet. In einer stationären Kultur überleben die bestrahlten Phagen wesentlich besser als in einer logarithmisch wachsenden. Das ist durchaus verständlich, wenn man die vielfältigen Stoffwechselaktivitäten einer logarithmisch wachsenden Zelle in Betracht zieht. Sie kann sich offensichtlich besser gegen einen Angriff von außen, hier den Phagen, wehren. Dieses Phänomen der Abhängigkeit des Überlebens des UV-bestrahlten Phagen vom Alter der Wirtszellen wurde bereits von Weigle (1958) beschrieben. Bei röntgenbestrahlten Phagen konnte in der vorliegenden Arbeit kein solcher Unterschied festgestellt werden. In Abbildung 4 stellt die Kurve 2 das Ergebnis einer UV-Inaktivierung von λ bei Verwendung stationärer Wirtszellen, die Kurve 3 dagegen das gleiche bei logarithmisch wachsenden Zellen dar.
2. Es liegt eine zusätzliche Abhängigkeit der Überlebensrate von λ vom Alter des Lysates vor. Der unterschiedliche Verlauf der Kurven 1 und 2 - in beiden Fällen wurden stationäre Wirtszellen verwendet- ist begründet in der Tatsache, daß die Kurve 1 direkt nach Herstellung des Lysates angefertigt wurde. Der Versuch, dessen Ergebnis die Kurve 2 zeigt, wurde dagegen mit einem Lysat durch-

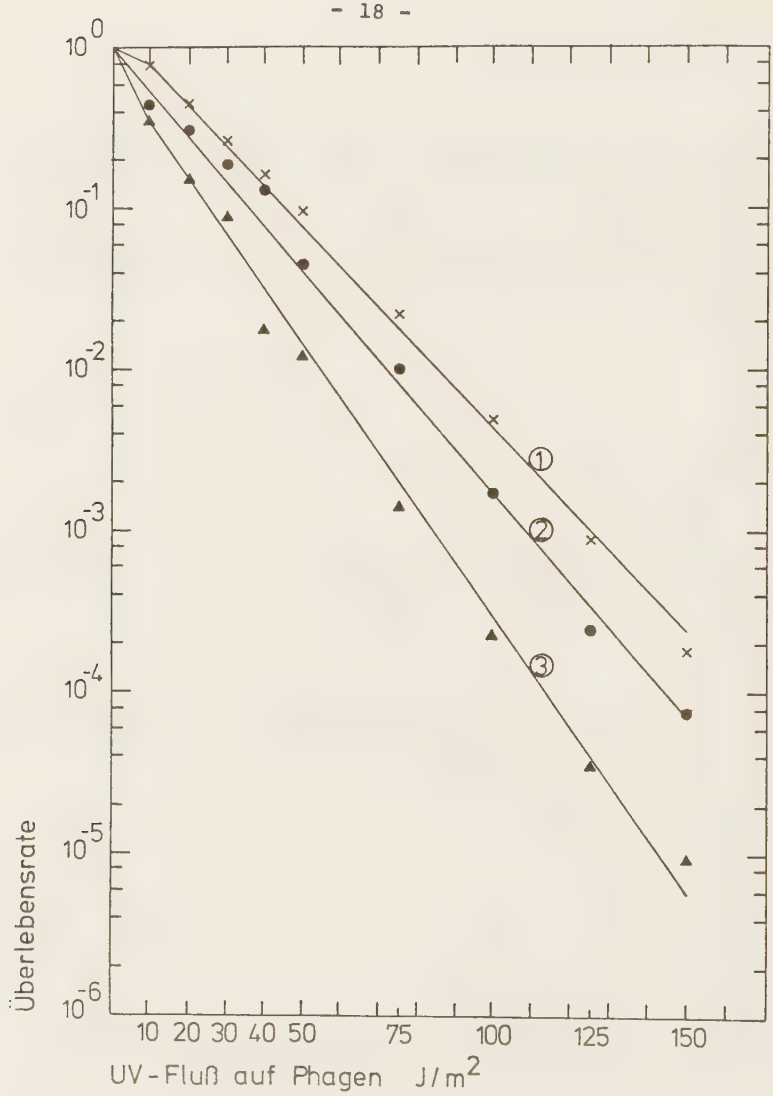

Abbildung 4:

Abhängigkeit der UV-Sensibilität des Phagen λ vom Alter des Lysates und der Wirtszellen E. coli AB 1157 wt.
Kurve 1: UV-Überlebenskurve des Phagen bei Verwendung eines frisch hergestellten Lysates und stationärer Wirtszellen
Kurve 2: UV-Überlebenskurve des Phagen bei Verwendung eines alten Lysates und stationärer Wirtszellen
Kurve 3: UV-Überlebenskurve des Phagen bei Verwendung eines alten Lysates und logarithmisch wachsender Wirtszellen

geführt, das 6 Monate lang bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt worden war. Daraus folgt, daß für das Phagenüberleben nach Bestrahlung die Wuchsphase der Wirtsbakterien von größerer Bedeutung ist als das Alter des Lysates. Für Abbildung 4 ist folgende Tabelle gültig:

Tabelle III

Kurve Nr.	Wirtszelle AB 1157	Lysat λ	Steigung α	Korrelations-Koeffizient r^2
1	stationär	frisch	- 0.0584	0.995
2	stationär	6 Mon. alt	- 0.0647	0.995
3	logarithmisch	6 Mon. alt	- 0.0783	0.994

Um eine eindeutige Aussage über das Ausmaß der Reaktivierung in Abbildung 3 machen zu können, wurde der Reaktivierungsfaktor (reactivation extent = RE) nach Ono und Shimazu (1966) bestimmt. Es gilt folgende Gleichung:
$RE = S_i/S_o \times S$. Dabei bedeutet S das Überleben des unbestrahlten Phagen λ auf röntgenbestrahltem Wirt, S_o das Überleben des UV-bestrahlten λ auf unbestrahltem Wirt und S_i das Überleben des UV-bestrahlten λ auf röntgenbestrahltem Wirt. Für die Reaktivierung des UV-bestrahlten Wildtyp E. coli AB 1157 gilt folgende Tabelle:

Tabelle IV

Dosis krd der Röntgenbestrahlung des Wirtes AB 1157	0	5	10	15	20	30
RE	1.0	7.1	11	12	15.2	12.8

Die Abbildung 5 zeigt die graphische Darstellung des RE.

Abbildung 5:

Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen λ (UV-Fluß: 100 J/m^2) durch röntgenbestrahlte Wirtszellen des Wildtyps E. coli AB 1157.
Die Kurve zeigt die graphische Darstellung der in Tabelle IV aufgeführten RE-Werte.
Abszisse: Dosis (krd) der Röntgenbestrahlung der Wirtszellen
Ordinate: Reaktivierungsfaktor $RE = S_i / S_o \times S$

Unbestrahlte logarithmisch wachsende Wirtszellen lassen den UV-bestrahlten Phagen schlechter überleben als stationäre Wirtszellen (Abbildung 4). Bestrahlt man sie jedoch vor der Präadsorption mit Röntgenstrahlen, sind sie in viel höherem Maße in der Lage, den UV-geschädigten Phagen zu reaktivieren, als es röntgenbestrahlte stationäre Wirtszellen sind.
Das Überleben des UV-bestrahlten Phagen λ auf dem mit 15 krd röntgenbestrahlten stationären Wirt E. coli AB 1157 zeigt Abbildung 6. Die Kurve 1 ist die Kontrollkurve für das Überleben des Phagen auf unbestrahltem Wirt. Der Versuch wurde mit einem 6 Monate alten Lysat durchgeführt. Die Kurve 2 zeigt die Reaktivierung durch den röntgenbestrahlten Wirt. Es gilt:

Kurve Nr.	Steigung α	Korrelationskoeffizient r^2
1	- 0.0645	0.998
2	- 0.0448	0.998

Die Berechnung des Reaktivierungsfaktors für den dem Phagen verabreichten UV-Fluß von 100 J/m^2 ergibt bei der Verwendung stationärer Wirtszellen den Faktor RE = 6.5, bei logarithmisch wachsenden Zellen nahezu den doppelten Wert von RE = 12. Bei der Art der Versuchsdurchführung wie sie in Abbildung 6 dargestellt ist, läßt sich außerdem die Reparatureffektivität E mit Hilfe des Dosisreduktionsfaktors DRF berechnen (Devoret et al., 1975):
$E = 1 - DRF = 1 - DRF = 1 - D_1/D_2$. Dabei ist D_1 derjenige UV-Fluß der angewendet werden muß, um ein bestimmtes Überleben des Phagen zu erreichen, wenn keine Reaktivierung stattfindet, D_2 derjenige der mit Reaktivierung zum selben Überleben führt. Stationäre Wirtszellen zeigen eine Reparatureffektivität von E = 1 - 0.70 = 0.30 also 30 %. Die Effektivität liegt damit um ca. 20 % niedriger als unter optimalen Voraussetzungen mit logarithmisch wachsenden Wirts-

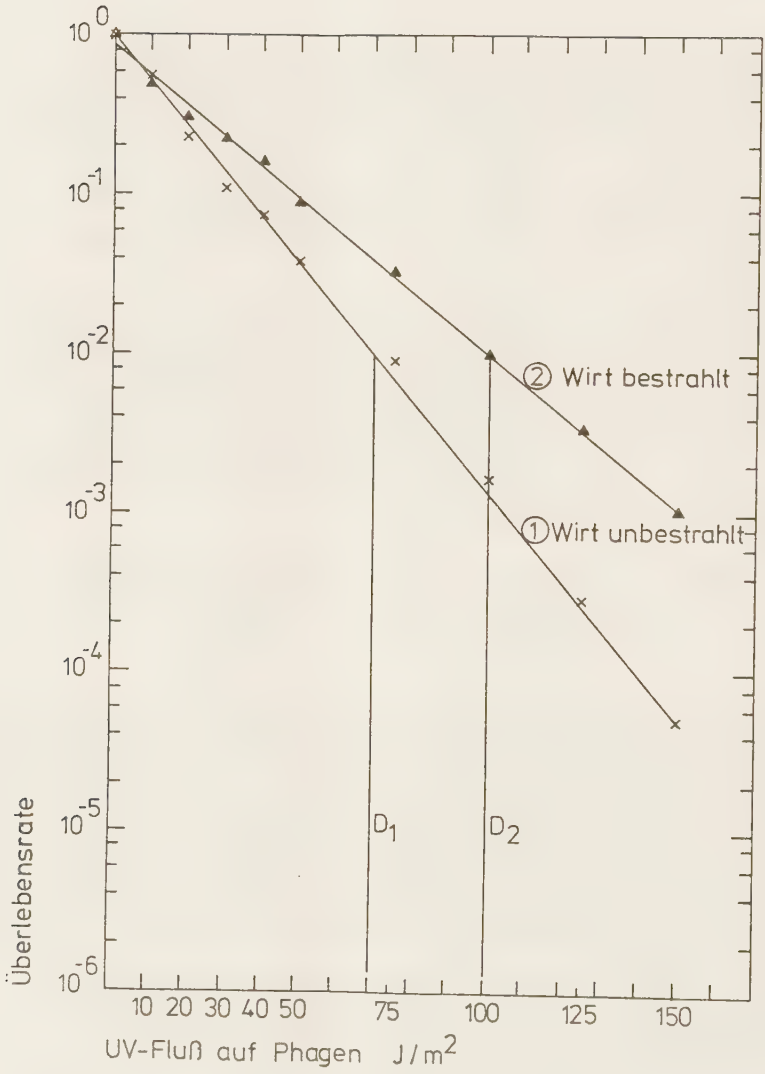

Abbildung 6:

Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen λ durch stationäre röntgenbestrahlte Wirtszellen des Wildtyps E. coli AB 1157.

Kurve 1: UV-Überlebenskurve des Phagen auf unbestrahlten Wirtszellen

Kurve 2: UV-Überlebenskurve des Phagen auf Wirtszellen, die vor der Präadsorption mit 15 krd röntgenbestrahlt wurden

zellen (50 % nach Devoret). Allgemein arbeitet die induzierte Phagenreaktivierung mit der gleichen Effektivität wie die Phagenreaktivierung. Die Reparatureffektivität der Wirtszellenreaktivierung (HCR) bis zu E = 85 %, wird jedoch nicht erreicht.

3.2.2. Versuche zur genetischen Kontrolle der induzierten Phagenreaktivierung

Die vorangegangenen Abschnitte befaßten sich mit der Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen durch den röntgenbestrahlten Wildtyp. Es war nun interessant festzustellen, unter welcher genetischen Kontrolle die durch Röntgenstrahlen induzierte Phagenreaktivierung abläuft, d.h. ob es sich dabei um die Induktion desselben Reparatursystems handelt, das die durch UV-Strahlen induzierte Phagenreaktivierung bedingt. Diese ist von den Wirtsgenen recA (Miura und Tomizawa, 1968), lex (Defais et al., 1971) und zab (Castellazzi et al., 1972 b) kontrolliert. Eine Abhängigkeit von den Genen recB und recC scheint nicht zu bestehen, da recB- und recC-Mutanten in der Lage sind, induzierte Phagenreaktivierung durchzuführen (Elsevier und Rove, 1969).
Wurde der Versuch mit E. coli AB 2470 (recB) als röntgenbestrahltem Wirtsstamm durchgeführt, so trat ebenfalls eine Reaktivierung auf (Abbildung 7). Es ist jedoch auffällig, daß das Maximum des Reaktivierungsfaktors erst bei höheren Dosen erreicht wird (bei ca. 40 krd) und wesentlich niedriger liegt (RE_{max} = 3.8) als der maximale Reaktivierungsfaktor, der durch Röntgenbestrahlung des Wildtyps induziert wird (RE_{max} = 15.2). Die Kurven 1 und 1 a der Abbildung 7 stellen analog den Kurven in der Abbildung 3 die Kapazität der Wirtszelle dar, den Phagen zu vermehren.
In der folgenden Tabelle sind die Werte für den durch Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Dosen im Wirtsstamm E. coli AB 2470 (recB) induzierten Reaktivierungsfaktor RE aufgeführt:

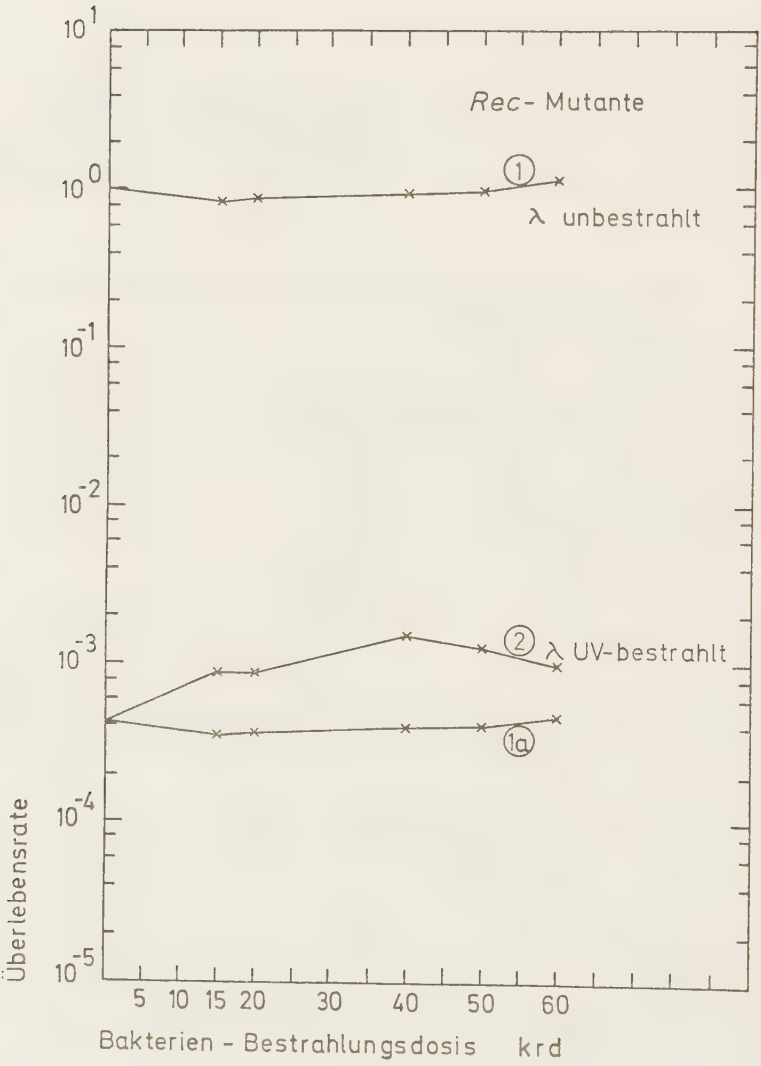

Abbildung 7:

Überleben des UV-bestrahlten Phagen λ (UV-Fluß: 100 J/m^2) auf röntgenbestrahlten Wirtszellen E. coli AB 2470 (recB).
Kurve 1 : unbestrahlter Phage auf röntgenbestrahltem Wirt
Kurve 1a : Projektion der Kurve 1 auf das Überleben des UV-bestrahlten Phagen auf unbestrahltem Wirt
Kurve 2 : UV-bestrahlter Phage auf röntgenbestrahltem Wirt

Tabelle V

Dosis krd der Röntgenbestrahlung des Wirtes AB 2470	0	15	20	40	50	60
RE	1.0	2.5	2.4	3.8	3.3	2.2

Abbildung 8 zeigt die graphische Darstellung.

Keinerlei Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen wurde gefunden, wenn E. coli AB 2463 (recA) vor der Präadsorption mit Röntgenstrahlen bestrahlt wurde (Abbildung 9). Da dieser Stamm seine DNA nach einer UV-Bestrahlung sehr stark abbaut (Clark et al., 1966), wurde vorsichtshalber mit niedrigeren Röntgendosen als bei den anderen Stämmen gearbeitet. Kurve 1 in Abbildung 9 (siehe auch Kurve 1a) zeigt, daß in diesem Dosisbereich kein Kapazitätsabfall zu beobachten ist.
Bei E. coli AB 1157 trat in dem gleichen Dosisbereich zwischen 0 krd und 5 krd bereits eine starke Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen auf (Abbildung 3). Bei E. coli AB 2470 (recB) war sie weniger stark, jedoch deutlich vorhanden (Abbildung 7). Abbildung 10 zeigt, daß der Reaktivierungsfaktor bei der Verwendung einer recA - Mutante als Wirtsstamm bei Werten um RE = 1.0 liegt, d.h. keine Reaktivierung stattfindet. Die durch Röntgenbestrahlung der Wirtszellen hervorgerufene Phagenreaktivierung ist somit die Folge der Induktion eines recA - Genabhängigen Reparatursystems. Als nächstes wurde die zeitliche Abhängigkeit der Induktion dieses Systems untersucht.

3.2.3. Versuche zur Kinetik des durch Röntgenbestrahlung induzierten Reparatursystems

Die folgenden Versuche wurden mit dem Wildtypstamm E. coli AB 1157 durchgeführt, da bei diesem Stamm die Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen am größten war. Zunächst wurde die

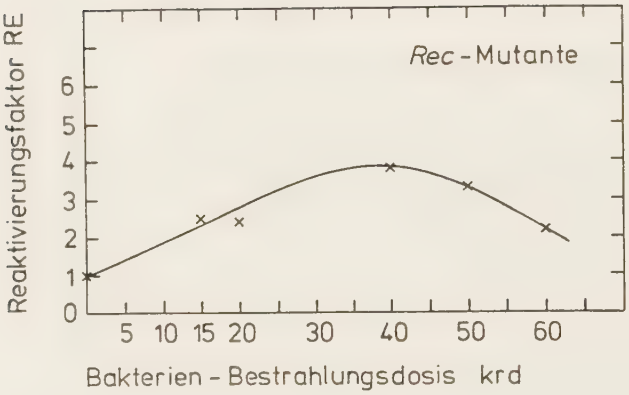

Abbildung 8:

Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen λ (UV-Fluß: 100 J/m^2) durch röntgenbestrahlte Wirtszellen E. coli AB 2470 (recB). Die Kurve zeigt die graphische Darstellung der in Tabelle V aufgeführten RE-Werte.
Abszisse : Dosis (krd) der Röntgenbestrahlung der Wirtszellen
Ordinate : Reaktivierungsfaktor RE= $S_i/S_o * S$

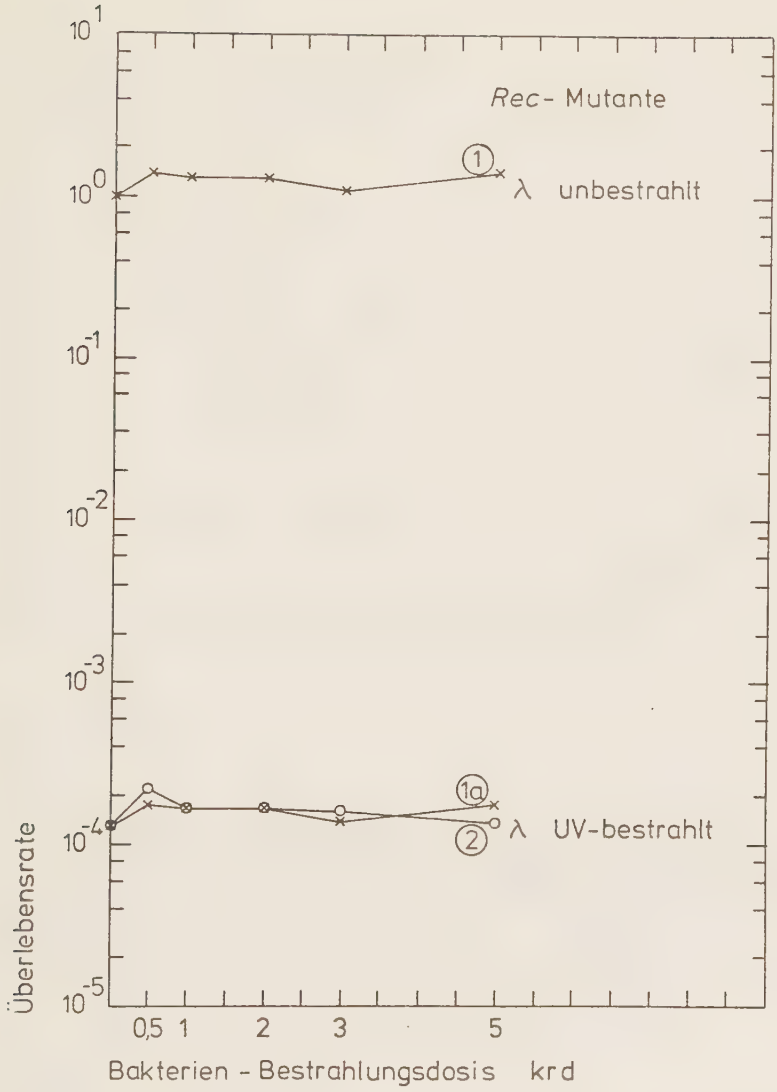

Abbildung 9:

Überleben des UV-bestrahlten Phagen λ (UV-Fluß: 100 J/m²) auf röntgenbestrahlten Wirtszellen E. coli AB 2463 (recA).
Kurve 1 : unbestrahlter Phage auf röntgenbestrahltem Wirt
Kurve 1a : Projektion der Kurve 1 auf das Überleben des UV-bestrahlten Phagen auf unbestrahltem Wirt
Kurve 2 : UV-bestrahlter Phage auf röntgenbestrahltem Wirt

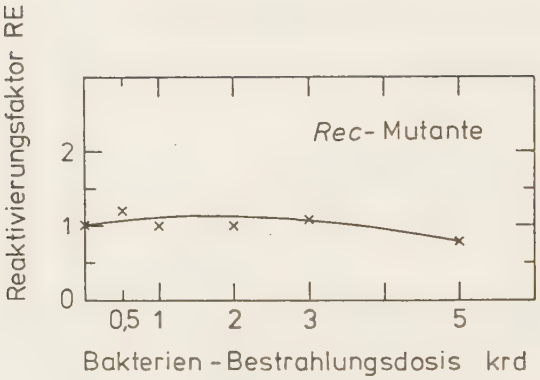

Abbildung 10:

Fehlende Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen λ (UV-Fluß:100 J/m^2) durch röntgenbestrahlte Wirtszellen E. coli AB 2463 (recA).
Die Kurve zeigt die graphische Darstellung der RE-Werte.
Abszisse : Dosis (krd) der Röntgenbestrahlung der Wirtszellen
Ordinate : Reaktivierungsfaktor RE= $S_i/S_o \times S$

Veränderung des Reaktivierungsfaktors durch eine zwischen Röntgenbestrahlung der Wirtszellen und Präadsorption des UV-bestrahlten Phagen durchgeführte Bebrütung der Wirtszellen untersucht.
Die bestrahlten Zellen wurden abzentrifugiert und in frischem LB 30 min lang bei 37° C im Schüttelwasserbad gehalten. Der Versuchsablauf entsprach im übrigen dem unter 3.2.1. beschriebenen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 11. Vergleicht man diese Abbildung mit der Abbildung 3, die das Überleben des UV-bestrahlten Phagen auf röntgenbestrahltem AB 1157 ohne eine Zwischenbebrütung zeigt, fällt folgendes auf:
Die Kurve 1, die wiederum die Kapazität der röntgenbestrahlten Wirtszelle, den unbestrahlten Phagen zu vermehren, zeigt, weist schon bei kleinsten Dosen der Röntgenbestrahlung des Wirtes ein deutliches Absinken des Phagenüberlebens auf, bleibt dann aber relativ konstant. Das bedeutet, daß die an die Röntgenbestrahlung anschließende Bebrütung der Wirtszellen zu einer niedrigeren Phagenausbeute führt. Sie beträgt ca. 55 % derjenigen, die erreicht wird, wenn die Präadsorption der Phagen sofort auf die Röntgenbestrahlung von E. coli AB 1157 folgt. Die Kurve 2 stellt die Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen nach 30 min dar (Abb. 11). Der Vergleich mit der Kurve 2 der Abbildung 3 zeigt, daß die Zwischenbebrütung das Maximum der Reaktivierung nach rechts, zu höheren Dosen der Röntgenbestrahlung verschiebt: bei 30 krd in Abbildung 11 und bei 20 krd in Abbildung 3.
In Abbildung 12 ist der Reaktivierungsfaktor dargestellt. Kurve 2 zeigt ihn nach 30-minütiger Zwischenbebrütung:

Tabelle VI

Dosis krd der Röntgenbestrahlung des Wirtes AB 1157	0	5	10	20	30	40	50	60
RE	1.0	2.3	6.1	10	14	9.8	9.8	5.1

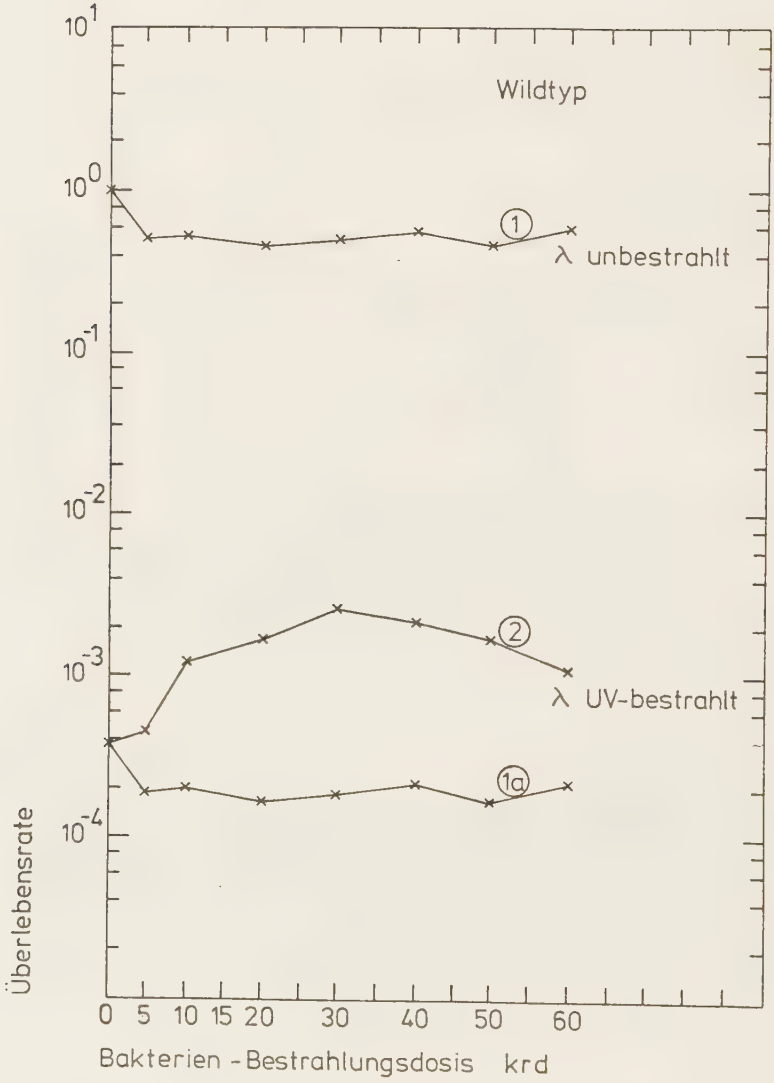

Abbildung 11:

Überleben des UV-bestrahlten Phagen λ auf röntgenbestrahlten Wirtszellen des Wildtyps E. coli AB 1157 nach 30 min Inkubation zwischen Bestrahlung des Wirtes und Phagenpräadsorption.

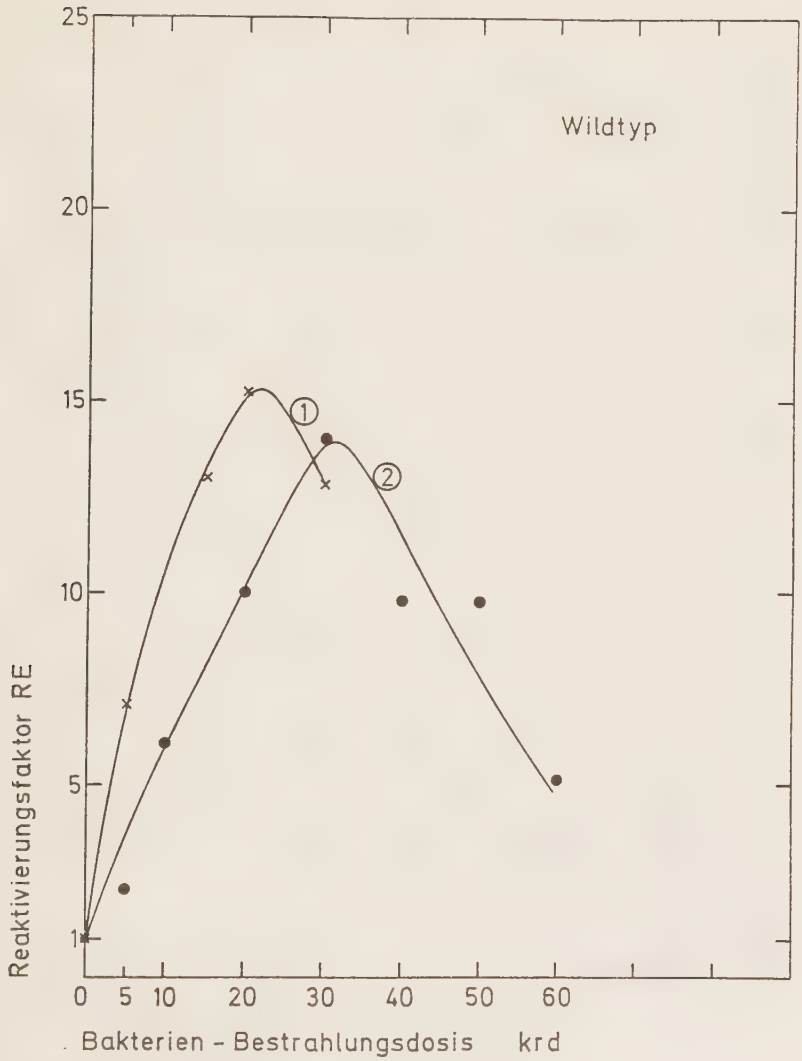

Abbildung 12:

Graphische Darstellung des Reaktivierungsfaktors RE nach 30 min Inkubation zwischen Röntgenbestrahlung des Wildtyps E. coli AB 1157 und Präadsorption des UV-bestrahlten Phagen (RE-Werte siehe Tabelle VI).
Kurve 1: RE ohne Inkubation (vgl. Abb. 5)
Kurve 2: RE nach 30 min Inkubation

Kurve 1 ist identisch mit Abbildung 5, lediglich der Maßstab wurde anders gewählt.
Im zweiten Versuch zur Kinetik des durch Röntgenbestrahlung induzierten Reparatursystems wurden die Wirtszellen mit einer bestimmten Dosis röntgenbestrahlt, danach jedoch verschieden lang zwischen Bestrahlung und Präadsorption bei 37° C im Schüttelwasserbad in LB inkubiert und der Reaktivierungsfaktor bestimmt. Die Kurven 1 und 2 der Abbildung 13 zeigen die Abhängigkeit des RE von der Inkubationszeit und von der Höhe der angewendeten Dosis der Röntgenbestrahlung zum Zeitpunkt O. Wenn keine Zwischenbebrütung stattgefunden hat, liegt der Reaktivierungsfaktor bei einem Wert von RE = 13.0, gleich ob man die Wirtszellen mit 15 krd oder mit 30 krd röntgenbestrahlt hat (vgl. Abbildung 5). Die RE-Werte nach einer Inkubationszeit von 5 min sind noch ähnlich, danach jedoch weichen die Kurven sehr stark auseinander, um nach 90 min auf annähernd den gleichen Wert zu treffen. Er liegt jedoch schon so nahe bei RE = 1.0, daß man hier nicht mehr von einer Reaktivierung sprechen kann. Die Kurve 1 (Röntgenbestrahlung von AB 1157 mit der Dosis D = 15 krd weist ihr Maximum bereits nach 5 min bei einem RE = 17.6 auf, um danach stark abzufallen. Die Kurve 2 (Röntgenbestrahlung von AB 1157 mit der Dosis D = 30 krd erreicht den maximalen RE = 19.6 nach 15 min Inkubationszeit. Der Abfall ist außerdem weniger steil.

Tabelle VII

Inkubationszeit in min	RE Röntgenbestrahlung von AB 1157 D = 30 krd	RE Röntgenbestrahlung von AB 1157 D = 15 krd
0	12.6	13.0
5	17.0	17.6
15	19.6	12.2
30	15.5	8.3
60	7.4	3.0
90	1.3	1.5

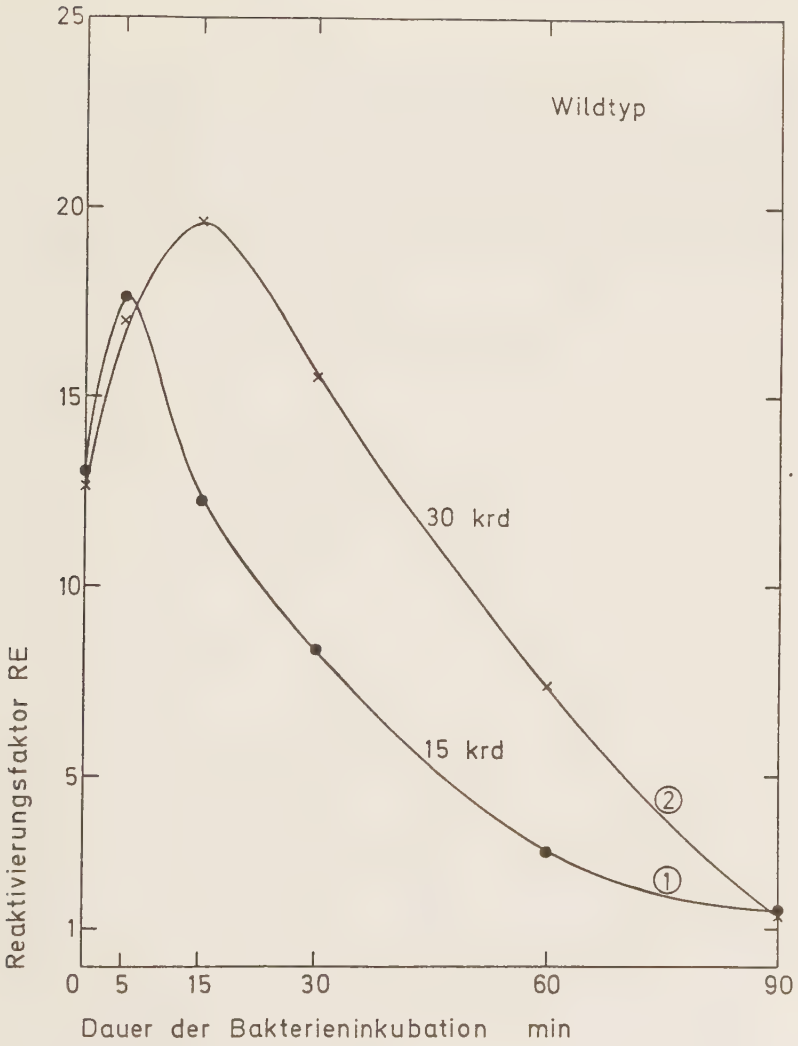

Abbildung 13:

Abhängigkeit des Reaktivierungsfaktors RE von der Inkubationszeit zwischen Röntgenbestrahlung des Wirtes E. coli AB 1157 wt und Präadsorption des UV-bestrahlten Phagen (RE-Werte siehe Tabelle VII).
Kurve 1 : RE nach Röntgenbestrahlung des Wirtes mit 15 krd
Kurve 2 : RE nach Röntgenbestrahlung des Wirtes mit 30 krd

Um eine maximale Reaktivierung durchführen zu können, brauchen die Zellen offensichtlich eine um so längere Inkubationszeit, je größer die ihnen verabreichte Dosis ist. Der Reaktivierungsfaktor ist dann aber auch nach längeren Inkubationszeiten noch groß im Vergleich zu dem, der durch eine Röntgenbestrahlung mit niedrigen Dosen induziert wird. (vgl. Inkubationszeit: 30 min, RE = 8.3 bei 15 krd und RE = 15.5 bei 30 krd). Bei beiden Kurven ist nach 90 min praktisch keine Reaktivierung mehr zu verzeichnen: RE = 1.3 bei 30 krd und RE = 1.5 bei 15 krd.

4. Diskussion

Bestrahlt man den Phagen λ extrazellulär zuerst mit Röntgenstrahlen und anschließend sofort mit UV-Strahlen, so tritt, abgesehen von der additiven Wirkung der beiden Bestrahlungsarten, keine zusätzliche Überlebensverschlechterung, also kein Synergismus, aber auch keine Protektion auf (nahezu parallele Kurven in Abbildung 1).
Martignoni und Smith (1973) konnten zeigen, daß zur Ausprägung eines synergistischen Effektes durch kombiniert angewandte Röntgen- und UV-Bestrahlung die Bakteriengene recA, recB, und lexA vorhanden sein müssen. Es ist deshalb anzunehmen, daß der Synergismus durch ein bestrahlungsbedingtes fehlerhaftes Ablaufen des von diesen Genen abhängigen Reparaturenzymsystems hervorgerufen wird. Sind die Gene mutiert, so daß die Synthese von normalen Reparaturenzymen von vornherein ausbleibt, wird eine Bestrahlung natürlich nicht mehr zum Synergismus führen.
Der Phage λ besitzt zwar nicht die Gene recA, recB, recC oder lexA, er verfügt aber über ein funktionell vergleichbares Gensystem, das für allgemeine Rekombination beim Phagen verantwortlich ist, nämlich die beiden red-Gene exo und beta (Echols und Gingery, 1968; Signer und Weil, 1968). Nach der Infektion der Wirtszelle werden sie transkribiert und die entsprechenden Enzyme werden gebildet. Da jedoch kein Synergismus auftritt (Abbildung 1) kann man daraus schließen, daß die red-Genprodukte nicht für den Synergismus verantwortlich sind. Abbildung 2 zeigt das Ergebnis der kombinierten Bestrahlung in umgekehrter Reihenfolge:
1. UV- und 2. Röntgenbestrahlung. Die Neigungen der Kurven 1 und 3 bzw. 4 sind nicht signifikant verschieden, d.h. eine Sensibilisierung der Phagen durch die vor der Röntgenbestrahlung angewendete UV-Dosis ist nicht zu verzeichnen. Eine Protektion, d.h. eine Überlebensverbesserung durch die der Röntgenbestrahlung vorangegangene UV-Bestrahlung,

wie sie von Hradecna et al. (1973) gefunden wurde, trat bei der Durchführung der kombinierten Bestrahlung, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben ist, nicht auf. Von Lochmann (1963) wurde berichtet, daß Röntgenstrahlen die durch eine UV-Bestrahlung hervorgerufenen Thymindimere in vitro spalten können. Die Effektivität dieses Mechanismus scheint jedoch in vivo (vgl. auch Lochmann, 1963) nicht groß zu sein.

Es konnte gezeigt werden, daß der UV-bestrahlte Phage λ durch einen röntgenbestrahlten Wirt reaktiviert werden kann. Ono und Shimazu (1966) hatten bei der Untersuchung der Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen øR die Wirtszellen nicht nur mit UV-Strahlen, sondern auch mit Röntgenstrahlen behandelt und dabei eine etwas geringere Reaktivierungseffektivität gefunden. Auch bei der hier untersuchten Reaktivierung des Phagen λ durch röntgenbestrahlte Wirtszellen liegt der maximale Reaktivierungsfaktor (RE = 15.2 bei röntgenbestrahltem E. coli AB 1157 Wildtyp), wesentlich unter dem Maximum der durch UV-Bestrahlung des Wirtes induzierten Reaktivierung (Caillet-Fauquet und Defais (1972); Defais et al. (1976)). Das induzierte Reparatursystem scheint demnach nicht so effektiv zu arbeiten, wenn Röntgenstrahlen anstelle von UV als Indiktor wirken. Bockstahler und Lytle (1971) fanden bei der Untersuchung der Reaktivierung von UV-bestrahltem Herpes simplex - Viren durch röntgenbestrahlte CV-1-Säugetierzellen jedoch den gleichen Reaktivierungsfaktor wie bei der Induktion durch UV-Strahlen.

Die durch Röntgenstrahlen induzierte Phagenreaktivierung scheint trotz der hier gefundenen geringeren Effektivität unter der gleichen genetischen Kontrolle zu stehen wie das durch UV-Strahlen induzierte Reparatursystem. Es besteht eine unbedingte Abhängigkeit von der Funktionsfähigkeit des recA-Gens, die recA-Mutante von E. coli K 12 kann keine Reaktivierung durchführen (vgl. auch Boiteux, 1976). Die Röntgenbestrahlung der recB-Mutante führte zwar zu einer Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen, erreichte aber

nicht den Wert der beim Wildtyp auftrat. Von Elsevier und Dove (1969) wird ebenfalls angegeben, daß die UV-Reaktivierung nicht recB-Gen-abhängig ist. Diese Tatsache muß jedoch noch gründlicher untersucht werden, da Silber und Achey (1976) z.B. berichten, daß bei der Untersuchung der Reaktivierung UV-geschädigter øx-174-DNA durch UV-bestrahlte Wirtszellen die Überlebensverbesserung nicht nur bei recA- und lexA-Stämmen sondern auch bei recB-Zellen fehlt. Der Phage øx-174 besitzt eine einsträngige DNA, während λ eine doppelsträngige DNA aufweist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Reparatur von λ in recB-Zellen zwar nicht völlig fehlt, jedoch mit deutlich geringerer Effektivität als beim Wildtyp von E. coli K 12 abläuft. Die Gene recB und recC sind verantwortlich für die Bildung einer DNase, der Exonuclease V (Buttin und Wright, 1968; Oishi, 1969; Barbour und Clark, 1970). Dabei handelt es sich um einen Enzymkomplex aus 4 Enzymen, von denen 3 Nucleaseaktivität und eins ATPase-Aktivität besitzen (Goldmark und Linn, 1970 und 1972). Es besteht nun die Frage, welche Role die Exonuclease V bei der induzierten Phagenreaktivierung spielt.
Zissler (1971) fand bei der Untersuchung des λ-Rekombinationssystems ein Gen, gam, dessen Produkt jedoch als Inhibitor der Exonuclease V wirkt. Dieses Genprodukt wird nach der Phageninfektion sowohl im Wildtyp als auch in recA-Mutanten (Enquist und Skalka, 1973) und recB-Mutanten synthetisiert. Die Exonuclease V wird also gehemmt. Eine direkte Beteiligung des Enzyms bei der induzierten Phagenreaktivierung scheint damit ausgeschlossen. Die Frage, warum die Reaktivierung in recB-Mutanten dennoch deutlich geringer ist als beim Wildtyp, nach anderen Autoren sogar fehlt, kann vorläufig nicht beantwortet werden. Die induzierte Phagenreaktivierung scheint jedenfalls nur mit maximaler Effektivität zu arbeiten, wenn die Funktionen der recA-, recB-, recC- und lexA-Gene sinnvoll koordiniert sind. Die Untersuchungen zur Kinetik des induzierten Reparatursystems wurden aus diesem Grunde mit dem

Wildtyp E. coli AB 1157 durchgeführt. Der Reaktivierungsfaktor war hier am größten.
Die Kurve 2 in Abbildung 11 zeigt die Reaktivierung des UV-bestrahlten Phagen nach 30 min Inkubation der Wirtszellen zwischen Röntgenbestrahlung und Phagenpräadsorption. Es fällt auf, daß höhere Dosen angewendet werden müssen, um das gleiche Ausmaß an Reaktivierung zu erhalten. Der maximale Reaktivierungsfaktor entsteht durch eine Bestrahlung der Wirtszellen mit der Dosis D = 30 krd, während er in Zellen, die nicht inkubiert wurden, durch eine Bestrahlung mit der Dosis D = 20 krd ausgelöst wird (Abbildung 12).
Die Inkubation läßt die Wirtszellen eine Röntgenbestrahlung mit niedrigen Dosen (bis D = 5 krd) offensichtlich "vergessen". Die DNA-Strahlenschäden sind nach 30 min wahrscheinlich repariert und das Reparaturenzymsystem ist nicht mehr aktiv. Die Folge davon ist, daß der UV-bestrahlte Phage durch diese Zellen nicht oder nur kaum reaktiviert werden kann. Die Anwendung höherer Röntgendosen führt zu mehr Schäden an der DNA. Die Reparatur nimmt längere Zeit in Anspruch, d.h. zum Zeitpunkt der Phageninfektion ist das Reparaturenzymsystem der Zelle noch aktiv. Dadurch scheint die Induktion der Phagenreaktivierung begünstigt zu werden, (vgl. Bockstahler et al., 1976).
Auffällig an Abbildung 11 ist noch, daß die Kapazität der bestrahlten Wirtszellen, den unbestrahlten Phagen zu vermehren (Kurve 1), nach 30 min Zwischenbebrütung geringer ist als ohne Zwischenbebrütung. Im Dosisbereich zwischen 0 krd und 5 krd sinkt das Überleben der unbestrahlten Phagen auf ca. 55 %, um dann, selbst bei höheren Dosen noch konstant zu bleiben.
Bestrahlt man die Wirtszellen mit 15 krd bzw. 30 krd und führt anschließend sofort die Präadsorption des UV-bestrahlten Phagen durch, ist der Reaktivierungsfaktor gleich groß (RE = 13 in Abbildung 13). Dieses Ergebnis stimmt mit dem in Abbildung 3 dargestellten Versuch gut überein. Die graphische Darstellung der dazu gehörenden Reaktivierungsfaktoren (Abbildung 5) zeigt, daß die Kurve bei D = 15 krd

ansteigt, bei D = 20 krd ihr Maximum aufweist, um dann bei D = 30 krd wieder auf den gleichen Wert wie bei D = 15 krd abzufallen.
Führt man nach der Bestrahlung verschieden lange Zwischenbebrütungen durch, erreicht die durch die Dosis D = 15 krd induzierte Reaktivierungskurve (Kurve 1 in Abbildung 13) schon nach 5 min den maximalen Wert, während die durch D = 30 krd induzierte das Maximum erst nach 15 min Inkubation erreicht (Kurve 2 in Abbildung 13). Letzeres ist größer und die Kurve zeigt einen weniger steilen Abfall. Interessant dabei ist, daß es in den Zellen offensichtlich innerhalb von wenigen Minuten zu einer Induktion des Reparatursystems kommt. Die Größe der Reaktivierung ist dabei von der Röntgendosis abhängig. Die niedrigere Dosis führt zu einem niedrigeren Reaktivierungsmaximum als die höhere Dosis. Wahrscheinlich konkurriert das Reparatursystem, das die durch die Röntgenbestrahlung entstandenen Schäden repariert, mit der Induktion des Phagenreaktivierungssystems. Je schneller die Schäden repariert werden, umso weniger Auslösefaktoren zur Induktion sind vorhanden. Die Kurve fällt nach längerer Inkubationszeit (=Reparaturzeit) steiler ab, wenn weniger DNA-Schäden durch die Bestrahlung entstanden sind (Kurve 1 und Kurve 2 in Abbildung 13). Die Effektivität des induzierten Reparatursystems ist demnach abhängig von der Höhe der den Wirtszellen verabreichten Röntgendosis.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bestrahlungseffekte an dem Bakteriophagen λ und seinen Wirtszellen, verschieden strahlensensiblen Mutanten von E. coli K 12 untersucht. Der Phage λ wurde in extrazellulärem Zustand mit Röntgen- und UV-Strahlen bestrahlt und das Überleben auf unbestrahlten E. coli-Wildtyp-Wirtszellen getestet. Im Gegensatz zu Bakterienzellen (E. coli) wurde beim extrazellulär bestrahlten Bakteriophagen weder ein synergistischer (Sensibilisierung) noch ein antagonistischer (Protektion) Bestrahlungseffekt festgestellt.

Dieses Ergebnis wird damit erklärt, daß der Phage λ nicht selbst über Reparaturenzyme verfügt, sondern diese durch die Wirtszelle synthetisiert werden. Bisherige Untersuchungen zeigten, daß ein Synergismus oder Antagonismus aber gerade durch Störung oder Förderung von Reparaturmechanismen zustande kommt.

Durch Röntgenstrahlen wird bei der Reaktivierung UV-bestrahlter Phagen in der Wirtszelle offensichtlich dasselbe Reparatursystem induziert wie durch UV-Strahlen. Die durch Röntgenstrahlen induzierte Phagenreaktivierung ist ebenfalls recA-Gen-abhängig. Die recA-Mutante von E. coli ist nicht in der Lage, eine Phagenreaktivierung durchzuführen, wohl aber der recB-Stamm. Die Reaktivierung erreicht dabei jedoch nicht die Größe der im Wildtyp induzierten: der maximale Reaktivierungsfaktor ist beim Wildtyp RE = 15.2, bei der recB-Mutante RE = 3.8.

Die zeitliche Abhängigkeit der Reparatur der UV-Schäden des Phagen durch den Wildtyp E. coli AB 1157 wurde näher untersucht. Die Wirtszellen wurden mit verschiedenen Dosen röntgenbestrahlt und 30 min zwischen Bestrahlung und Präadsorption des UV-bestrahlten Phagen in Medium bei 37° C inkubiert und der Reaktivierungsfaktor bestimmt. Es mußten

höhere Röntgendosen aufgewendet werden, um das gleiche Reaktivierungsausmaß wie bei dem Versuch ohne Zwischenbebrütung der Wirtszellen zu erreichen. Die röntgenbestrahlte Wirtszelle "vergißt" während dieser Zeit eine Bestrahlung mit niedrigen Dosen.
Als nächstes wurde der Wildtyp mit einer bestimmten Dosis röntgenbestrahlt und verschieden lang zwischen Bestrahlung und Phagenpräadsorption bei 37° C in Medium inkubiert. Die den Wirtszellen verabreichten Dosen betrugen 15 krd und 30 krd. Die Lebensdauer des induzierten Reparatursystems ist unabhängig von der Höhe der angewendeten Dosis der Röntgenbestrahlung und liegt bei 90 min. Der Reaktivierungsfaktor, der durch die Bestrahlung mit 15 krd hervorgerufen wird, ist jedoch kleiner als der durch 30 krd induzierte, d.h. die Effektivität ist geringer. Der maximale Wert wird zwar nach kürzeren Inkubationszeiten erreicht (5 min bei 15 krd und 15 min bei 30 krd), beträgt aber nur RE = 17.6, während bei der Bestrahlung der Wirtszellen mit der doppelten Dosis das Maximum bei RE = 19.6 liegt. Im Laufe der Versuchsdurchführungen konnte eine Abhängigkeit der UV-Sensibilität des Phage λ vom Alter des Lysates und vom Alter der infizierten Wirtszellen festgestellt werden. Der UV-geschädigte Phage überlebte auf stationären Zellen besser als auf logarithmisch wachsenden, während in letzteren die durch Röntgenbestrahlung induzierte Phagenreaktivierung effektiver war. Außerdem war ein frisch hergestelltes Phagenlysat unempfindlicher gegenüber UV-Bestrahlung als eines, das 6 Monate bei 4° C aufbewahrt worden war.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams, M. H. (1966): Bacteriophages, Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney

2. Albertsson, P. A. (1967): Two-phase separation of viruses. Methods in Virology, 2, 303-321

3. Barbour, S. D. and Clark, A. J. (1970): Biochemical and genetic studies of recombination proficiency in Escherichia coli. I. Enzymatic activity associated with recB$^+$ and recC$^+$ genes. Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 65, 955-961

4. Bhaumik, G. and Bhattacharjee, S.B. (1968): Interaction of x-ray and ultraviolet ray in killing cells. Nature, 218, 1077-1079

5. Blanco, M. and Devoret, R. (1973): Repair mechanisms involved in prophage reactivation and UV-reactivation of UV-irradiated phage λ. Mut. Res., 17, 293-305

6. Blanco, M. and Levine, A. and Devoret, R. (1975): LexB: A new gene governing radiation sensitivity and lysogenic induction in E. coli K-12

In: Molec. mechan. for repair of DNA, Part B, P. C. Hanawalt, R. B. Setlow eds., Plenum Press, New York, London, 379-382

7. Bockstahler, L. E. and Lytle, C. D. (1971): X-ray enhanced reactivation of ultraviolet-irradiated human viruses. J. Virol., 8, 601-602

8. Bockstahler, L. E. and Lytle, C. D. and Stafford, J. E. and Haynes, K. F. (1976): Ultra violet enhanced reactivation of a human virus: effect of delayed infection. Mut. Res., 35, 189-198

9. Boiteux, S. (1976): Induction de la W-reactivation du phage λ par les rayons gamma. In: Etude biochimique chez E. coli d'un mêcanisme de réparation inductible et mutagène. Thèse présentée pour l'obtention du grade légal de Docteur en Sciences. P. Caillet-Fauquet ed., Université Libre de Bruxelles, Appendice II, 67-73

10. Boyle, J. M. and Setlow, R. B. (1970): Correlations between host-cell reactivation, UV-reactivation and pyrimidine dimer excision in the DNA of bacteriophage λ. J. Mol. Biol., 51, 131-144

11. Buttin, G. and Wright, M. (1968): Enzymatic DNA degradation in E. coli: Its relation to synthetic processes at the chromo-

some level.
Cold Spring harbor Symposium of Quantitative Biology, 33, 259-269

12. Caillet-Fauquet, P. and Defais, M. (1972): UV-reactivation of phage λ in a polA mutant of E. coli. Mutat. Res., 15, 353-355

13. Castellazzi, M. and George, J. and Buttin, G. (1972a): Prophage induction and cell division in E. coli. I. Futher characterization of the thermosensitive mutation tif-1 whose expression mimics the effect of UV-irradiation. Molec. Gen. Genet., 119, 139-152

14. Castellazzi, M. and George, J. and Buttin, G. (1972b): Prophage induction and cell division in E. coli. II. Linked (recA, zab) and unlinked (lex) supressors of tif-1-mediated induction and filamentation. Molec. Gen. Genet., 119, 153-174

15. Clark, A. J. and Chamberlin, M. and Boyce, R. P. and Howard-Flanders, P. (1966): Abnormal metabolic response to ultraviolet light of a recombination deficient mutant of E. coli K-12. J. Mol. Biol., 19, 442-454

16. Clarkson, C. and Dewey, D. L. (1971): Abstract of the 8th meeting of the European Society of Radiation Biology

17. Defais, M. and Caillet-Fauquet, P. and Radman, M. and Errera, M. (1971): UV-reactivation and UV-mutagenesis of λ in different genetic systems. Virology, 43, 495-503

18. Defais, M. and Caillet-Fauquet, P. and Fox, M. S. and Radman, M. (1976): Induction of the mutagenic inducible repair in E. coli following ultraviolet irradiation. Molec. Gen. Genet., 148, 125-130

19. Devoret, R. and Blanco, M. and George, J. and Radman, M. (1975): Recovery of phage λ from ultraviolet damage. In: Molec. Mechan. for Repair of DNA, Part A, P. C. Hanawalt, R. B. Setlow eds., Plenum Press, New York, London, 155-171

20. Durban, E. and Gresz, N. (1969): Resistance of spores of Clostridium botulinum 33A to combinations of ultraviolet and gamma rays. Appl. Microbiol., 18, 44-50

21. Echols, H. and Gingery, R. (1968): Mutants of bacteriophage λ defective in vegetative genetic recombination. J. Mol. Biol., 34, 239-249

22. Elsevier, S. and Dove, W. F. (1969): Abstract of Phage Meetings, Cold Spring Harbor

23. Enquist, L. W. and Skalka, A. (1973): Replication of bacteriophage λ DNA dependent of host and viral genes. L. Interaction of red, gam and rec. J. Mol. Biol., 75, 185-212

24. Fricke, H. and Hart, E. J. (1966): Chemical Dosimetry In: Radiation Dosimetry, F. H. Attix, W. C. Roesch eds., Academic Press, New York, 2, 167-239

25. Goldmark, P. J. and Linn, S. (1970): An endonuclease activity from E. coli absent from certain rec⁻ -strains. Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 67, 434-441

26. Goldmark, P. J. and Linn, S. (1972): Purification and properties of the recBC DNase of E. coli K-12. J. Biol. Chem., 247, 1849-1860

27. Haynes, R. H. (1964): Molecular localization of radiation damage relevant to bacterial inactivation. In: Physical Processes in Radiation Biology, L. Augenstein, R. Mason, B. Rosenberg eds., Academic Press, New York, 51-72

28. Haynes, R. H. (1966): Inactivation recovery. Rad. Res. Suppl., 6, 18-29

29. Hellman, K. B. and Haynes, K. F. and Bockstahler, L. E. (1974): Radiation-enhanced survival of a human virus in normal and malignant rat cells (37788). Proc. of the Soc. for Experim. Biol. and Med., 145, 255-262

30. Hill, R. F. (1958): Independent inactivation of bacteriophage T1 by x-rays and ultraviolet light. Rad. Res., 8, 46-50

31. Hout, A. and van de Putte, P. and De Jonge, A. J. R. and Schuite, A. and Oosterbaan, R. A. (1970): Interference between the recA product and an ATP-dpendent exonuclease in extracts of E. coli. Biochim. Biophys. Acta, 224, 285-287

32. Hradecnà, Z. and Toufarovà, D. and Korcàkova, J. (1973): Effect of low dosis of ultraviolet radiation on bacteriophages. Studia Biophysica, Berlin 36/37, 75-80

33. Kneser, K. D. and Metzger, K. and Sauerbier, W. (1965): Evidence of different mechanisms for ultraviolet reactivation and "ordinary" host cell reactivation of phage λ. Virology, 27, 213-221

34. Martignoni, K.D. and Smith, K. C. (1973): The synergistic action of ultraviolet and x-radiation on mutants of E. coli K-12. Photochem. Photobiol., 18, 1-8

35. Lochmann, E. R. (1963): Spaltung von Thymindimer in monomeres Thymin durch Röntgenstrahlen. Naturwissenschaften, 50, 474-475

36. Miura, A. and Tomizawa, J. (1968): Studies on radiation sensitive mutants of E. coli. III. Participation of the rec-system in induction of mutation by ultraviolet irradiation. Molec. Gen. Genet., 103, 1-10

37. Oishi, M. (1969): An ATP-dpendent deoxyribonuclease from E. coli with a possible role in genetic recombination. Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 64, 1292-1299

38. Ono, J. and Shimazu, Y. (1966): Ultraviolet reactivation of a bacteriophage containing a single-stranded deoxyribonucleic acid as a genetic element. Virology, 29, 295-302

39. Otsuji, N. and Okuba, S. (1960): Reactivation of ultraviolet and nitrous acid - inactivated phages by host cells. Virology, 12, 607-609

40. Radman, M. and Devoret, R. (1971): UV-reactivation of bacteriophage λ in excision-deficient hosts: independence of red-functions and attachemant regions. Virology, 43, 504-506

41. Radman, M. (1975): SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. In: Molec. Mechan. for Repair of DNA, Part A, P. C. Hanawalt, R. B. Setlow eds., Plenum Press, New York, London, 355-367

42. Signer, E. R. and Weil, J. (1968): Recombination in bacteriophage λ. I. Mutants deficient in general recombination. J. Mol. Biol., 34, 261-171

43. Silber, J. R. and Achey, P. M. (1976): UV-reactivation of single strand DNA. Abstract of the Meeting of the Radiation Research Society, San Francisco

44. Unger, R. C. and Echols, H. and Clark, A. J. (1972): Interaction of the recombination pathways of bacteriophage λ and host E. coli: Effects on λ recombination. J. Mol. Biol., 70, 531-538

45. Unger, R. C. and Clark, A. J. (1972): Interaction of the recombination pathways of bacteriophage λ and its host E. coli K-12: Effects on exonuclease V activity. J. Mol. Biol., 70 539-548

46. Wackernagel, W. (1972): An improved spheroplast assay for λ-DNA and the influence of the bacterial genotype on the transfection rate. Virology, 48, 94-103

47. Weigle, J.J. (1953): Induction of mutations in a bacterial virus. Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 39, 628-636

48. Willetts, N. S. and Clark, A. J. (1969): Characteristics of some multiply recombination-deficient strains of E. coli. J. Bacteriol., 100, 231-239

49. Zissler, J. and Signer, E. R. and Schäfer, F. (1971): The role of recombination in growth of bacteriophage λ. I. The gamma gene. In : The Bacteriophage Lambda. A. E. Hershey ed., Cold Spring Harbor, N. Y., 455

Danksagung

Für die Anregung zu dieser Arbeit und die freundliche und hilfreiche Unterstützung danke ich Professor Hug, der mir die Betreuung dieses speziellen mikrobiologischen Themas durch Dr. rer. nat. Martignoni ermöglichte.

Dr. Martignoni war ein engagierter Berater, der mir aufgrund seiner mikrobiologischen Fachkenntnisse mit vielen wertvollen Hinweisen stets hilfreich zur Seite stand.

Mein Dank gilt ebenso Priv. Doz. Dr. Trott, der nach dem frühen unerwarteten Tod Professor Hugs selbstverständlich die Betreuung meiner Arbeit übernahm, so daß ich sie dank seiner fachlichen Hilfe beenden konnte.

Für das angenehme Arbeitsklima im Labor danke ich nicht zuletzt Frau Sternahl, die mir in ihrer netten Art half, viele technische Fragen zu lösen.

Lebenslauf

Ich wurde am 24. 10. 1949 als älteste von drei Kindern des Diplom-Chemikers Dr. Helmut Kalenda und seiner Ehefrau Margarete Kalenda in Marl in Westfalen geboren.

Nach 4 Jahren Volksschule besuchte ich das Neusprachliche Gymnasium am Ort. 1968 machte ich das Abitur und begann in Erlangen Biologie zu studieren. Nach dem Vordiplom wechselte ich 1971 an die TU in München. Hier schlug ich die Fachrichtung Mikrobiologie ein.

Im Jahr 1974 machte ich die Diplomprüfung. Das Thema der Arbeit lautete: "Biochemische Charakterisierung von Zellhüllkomponenten einer polymyxinsensitiven und einer polymyxinresistenten Form von Proteus rettgeri."
Von November 1974 bis Dezember 1976 arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft im Strahlenbiologischen Institut der Universität München.
1975 heiratete ich den Arzt Dr. Gerhard Haselbacher.
Im selben Jahr begann ich das Studium der Medizin an der LMU München, das ich im Winter 1980 beendete.